

SYNTHESE ET METABOLISME DE L'ARN "TARDIF" DU VIRUS
POLYOME PENDANT L'INFECTION LYTIQUE DE CELLULES DE
SOURIS EN CULTURE

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologique

par

Elena BUETTI

de

Muralto (TI)

Texte condensé de la thèse No 1647 approuvée par la Faculté
des Sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1647

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

UNIVERSITE DE GENEVE

FACULTE DES SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

Professeur R. Weil

SYNTHESE ET METABOLISME DE L'ARN "TARDIF" DU VIRUS
POLYOME PENDANT L'INFECTION LYTIQUE DE CELLULES DE
SOURIS EN CULTURE

THESE

présentée à la Faculté des sciences de l'Université de Genève
pour obtenir le grade
de docteur ès sciences, mention biologique

par

Elena BUETTI

de

Muralto (TI)

Texte condensé de la thèse No 1647 approuvée par la Faculté des Sciences.

Des copies en microfilms du texte complet peuvent être obtenues auprès de la Bibliothèque publique et universitaire de Genève.

Le texte complet peut être consulté à cette bibliothèque ou à la Bibliothèque nationale suisse à Berne.

Thèse No 1647

GENEVE

Imprimerie de la Section de physique

1974

La faculté des sciences, sur le préavis du professeur
R. WEIL, Département de Biologie Moléculaire, directeur
de thèse, et du Dr. K. SCHERRER (Institut Suisse de
Recherches Expérimentales sur le Cancer, Lausanne),
autorise l'impression de la présente thèse, sans exprimer
d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 18 mars 1974

Le Doyen :

Thèse No 1647

Jean MULLER



Ce travail de recherche a été présenté devant la Faculté des Sciences de l'Université de Genève au printemps 1974 pour remplir, en partie, les conditions posées à l'obtention du doctorat-ès-Sciences.

C'est sous la direction du professeur R. Weil que ce travail a été entrepris à l'Institut Suisse de Recherches Expérimentales sur le Cancer à Lausanne, poursuivi et mené à terme au Département de Biologie Moléculaire de l'Université de Genève. Je tiens à remercier ici le professeur Weil des conseils, de l'encouragement et du soutien scientifique et matériel qu'il m'a prodigués tout au long de cette recherche.

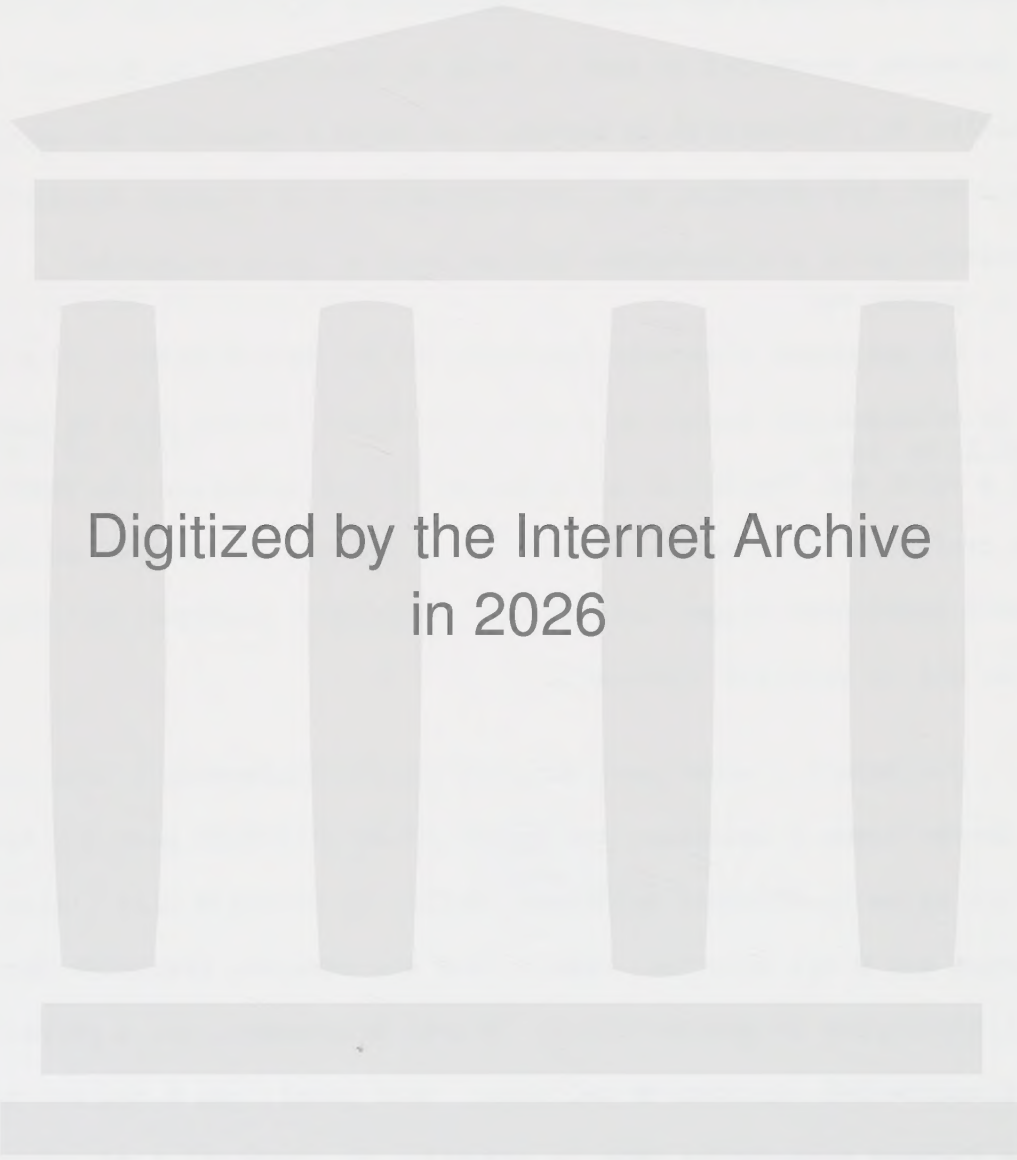
Ma gratitude s'adresse également au Dr. Nick Acheson; il m'a initiée à la méthodologie propre au domaine concerné; durant plus de quatre ans il a suivi mon travail et m'a assistée de ses conseils. Je remercie aussi le professeur K. Scherrer à Lausanne, ainsi que les membres de son groupe. Leurs nombreuses suggestions et leur assistance pratique ont constitué pour moi un précieux stimulant.

J'aimerais d'autre part exprimer ma reconnaissance à tous ceux qui, à Genève comme à Lausanne, ont manifesté de l'intérêt pour mon travail et m'ont aidée de diverses manières. Enfin, je voudrais dire l'aide précieuse que m'ont apportée, chacun dans son domaine, Françoise Marti, collaboratrice de grande valeur; Mourad Bensemmane, qui a préparé d'innombrables cultures de cellules; Otto Jenni, qui a réalisé toutes les figures reproduites dans ce travail. Et j'associe à mes remerciements tous les membres du groupe auquel j'ai appartenu durant plusieurs années.

*

*

*



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545902_0026

INTRODUCTION

Le virus polyome appartient à un groupe qui comprend de petits virus animaux de composition et de structure semblables, qui provoquent des verrues et des tumeurs. Parmi eux, SV40 (simian virus 40), Shope papilloma virus, et le virus de la verrue chez l'homme. Depuis quelques années, polyome et SV40 font l'objet d'études expérimentales approfondies, grâce au fait qu'ils peuvent être étudiés dans des cellules en culture (1,2,3). Le virus polyome est endémique dans la souris, dont il a été isolé en 1953 (4). SV40 est endémique dans le singe et il a été isolé à partir de cultures de reins de singes en 1960 (5).

Ce sont des virus de forme polyhédrique, de 45 nm de diamètre, composés d'une capsidie protéique extérieure renfermant le matériel génétique du virus, une molécule d'acide désoxyribonucléique (ADN). Cet ADN a une structure caractéristique, commune à tous les virus du groupe: il est circulaire et bicaténaire, les deux chaînes étant topologiquement entrelacées (6,7); en plus, chaque molécule intacte a une structure superhélicale (8,7). Les ADN de polyome et SV40 ont à peu près le même poids moléculaire (environ 3 millions de daltons; 8,9,10,11), mais diffèrent dans la composition en bases et leur séquence (6,12,13). Toutefois, bien qu'étant génétiquement différents, polyome et SV40 ont des effets biologiques analogues.

Quand l'un ou l'autre de ces virus est employé pour infecter des cellules en culture, la réponse que l'on obtient dépend du type de cellule. Selon que les cellules sont permissives ou non pour le virus donné, celui-ci donne lieu à une infection lytique, aboutissant à la reproduction du virus et à la destruction de la cellule, ou bien à une infection abortive, sans

production de virus. Dans les deux cas, le virus s'attache à la membrane cellulaire et est ingéré par pinocytose à l'intérieur de la cellule, où l'ADN est libéré de sa capside protéique et pénètre dans le noyau (14).

Dans les infections lytiques, l'information nécessaire à la réplication du virus est transcrite et traduite en une succession ordonnée d'événements. Le premier effet détectable de l'infection est l'apparition, en très faible quantité, d'un acide ribonucléique (ARN) spécifié par le virus ("ARN 19S précoce"; 15,16). Il est transcrit de l'ADN parental dans le noyau et migre dans le cytoplasme, où il pourrait agir comme ARN messager pour la synthèse de l'antigène T. Cet antigène intranucléaire est spécifique pour chaque virus, et en constitue une des fonctions précoces (17,18). Peu après l'apparition de l'antigène T, on observe une stimulation de la synthèse de l'ARN cellulaire, suivie de la réplication de la chromatine (19), qui semble être nécessaire à la réplication de l'ADN viral.

Le début de la synthèse d'ADN cellulaire et viral est très asynchrone dans des cellules individuelles, et il a lieu dans un petit nombre de cellules à partir de 12 heures après l'infection. Ensuite, un nombre croissant de cellules entre dans la phase synthétique et pendant la période tardive de l'infection (25 à 30 heures après infection) la grande majorité d'entre elles produit de l'ADN viral et cellulaire. Pendant cette phase, les cellules produisent aussi de l'ARN viral "tardif"; cet ARN dirige la synthèse des protéines structurelles du virus, qui sont nécessaires à l'assemblage de la progéniture virale. Celle-ci est libérée dans le milieu quand les cellules commencent à lyser, 30 à 35 heures après l'infection.

Dans les infections abortives de cellules non permissives, au contraire, il n'y a pas de production de virus. Toutefois, beaucoup de cellules expriment transitoirement des fonctions semblables à celles de la phase précoce d'une infection lytique: antigène T, stimulation de la synthèse d'ARN cellulaire, induction de la réplication de la chromatine, suivie d'une mitose. Il manque toutefois des facteurs cellulaires pour la réplication de l'ADN viral. Cette stimulation mitotique semble être étroitement liée à la "transformation cellulaire" et à la formation de tumeurs. L'étude de ce phénomène et du rôle joué par le virus sont actuellement un sujet majeur de recherche en virologie et ne constituaient pas le but de mon travail. Il est toutefois clair qu'un même virus peut provoquer des réponses très différentes selon le type de cellules qu'il infecte. On peut donc espérer que de l'étude détaillée des fonctions virales dans des cellules infectées on pourra aussi obtenir des connaissances sur des mécanismes de régulation de la cellule animale, tels que le contrôle de l'activité mitotique et de la fonction de transcription.

Le but de mon travail consistait à définir en termes moléculaires le mode de synthèse et le métabolisme de l'ARN tardif de polyome, c'est-à-dire l'ARN synthétisé après le début de la réplication de l'ADN viral.

Les résultats obtenus montrent que l'ARN tardif est synthétisé dans le noyau sous forme de grandes molécules qui semblent être clivées et ensuite transportées dans le cytoplasme, où on trouve deux classes de molécules plus petites (ARN 16S et 19S), associées aux polyribosomes. Ces deux ARN constituent l'ARN messenger tardif du virus.

Synthèse d'ARN viral pendant l'infection lytique.

Il a été montré que l'ADN purifié tant de polyome que de SV 40 est infectieux (8, 20), ce qui implique que l'ADN contient tout ce qui est nécessaire au virus pour produire une infection lytique dans un environnement permissif. (Il est ainsi probable que l'information contenue dans l'ADN du virus est transcrite par une polymérase cellulaire - 21.). La transcription de l'information génétique du virus est par conséquent un des stades où pourrait s'exercer la régulation que l'on constate dans le déroulement de l'infection.

L'étude de l'expression génétique de polyome ou de SV 40 est compliquée par le fait que les cellules infectées continuent à synthétiser leur propre ARN, qui constitue toujours la grande majorité de l'ARN produit. Pour suivre la synthèse d'ARN viral, il faut alors utiliser des techniques d'hybridation moléculaire, fondées sur la complémentarité entre les séquences de l'ARN et celles de l'ADN qui a servi de matrice pour la transcription. Par exemple, on incube, dans des conditions bien définies, de l'ARN de cellules infectées (marqué avec un isotope radioactif) avec de l'ADN du virus, purifié, dénaturé et fixé sur des filtres de nitrocellulose; l'ARN viral a alors la possibilité de former avec l'ADN des molécules hybrides et d'être ainsi protégé contre la digestion par l'enzyme ribonucléase (22). Cela permet de détecter de petites quantités d'ARN viral radioactif sur un fond important d'ARN cellulaire.

C'est par une technique de ce type que Benjamin (23) a pu démontrer l'existence d'ARN viral dans des cellules infectées par polyome. Selon ses résultats, et ceux d'autres groupes qui les ont par la suite confirmés (24) et étendus à SV40 (25, 26, 27), de petites quantités d'ARN viral dit "précoce" (environ le 0.01 pour cent de l'ARN marqué) sont présentes dans

les cultures dès les premières 3 à 6 heures après l'infection, et s'accroissent lentement, tout en restant à un bas niveau. Ce n'est qu'après le début de la réplication de l'ADN viral que l'on peut observer une augmentation rapide de la quantité d'ARN viral dans la culture (ARN "tardif"), jusqu'à des valeurs de quelques pour-cent, vers la fin de la phase tardive de l'infection, quand la plupart des cellules synthétisent de l'ADN viral.

Il fut ensuite établi que cette augmentation de l'ARN viral, successive au début de la réplication de l'ADN, allait de pair avec un changement du mode de transcription, et que ce changement n'avait pas lieu si la synthèse d'ADN était bloquée par des inhibiteurs tels que la fluorodesoxyuridine ou l'arabinoside de cytosine. Des expériences d'hybridation compétitive entre des ARN précoces et tardifs mis en présence de quantités limitantes d'ADN viral ont révélé que les séquences contenues dans les ARN précoces et tardifs ne sont pas identiques. Plus précisément, l'ARN précoce ne contient qu'environ un tiers des séquences présentes dans l'ARN tardif, tandis que l'ARN tardif contient toutes les séquences de l'ARN précoce. (24, 25, 26, 27)

D'autre part, des expériences de saturation de l'ADN viral avec de l'ARN extrait de cellules infectées (28,29) ont montré qu'au cours du cycle lytique dans son ensemble il y a transcription de séquences complémentaires à environ 50% du génome viral, c'est-à-dire de l'équivalent d'une chaîne d'ADN.

Cette approche expérimentale permet de détecter la présence de séquences virales et de déterminer si différentes populations d'ARN viral contiennent différentes séquences ou les mêmes; mais elle ne permet ni d'établir sous quelle forme moléculaire ces séquences sont présentes, ni de connaître leur mode de synthèse. C'est à ce problème que nous nous sommes attaqués,

en essayant de déterminer la taille et le mode de synthèse de l'ARN tardif du virus polyome. Ce type d'information peut être obtenu en combinant des méthodes classiques d'analyse de la taille de molécules d'ARN avec le test d'hybridation décrit plus haut.

Les résultats résumés ci-dessous sont tirés d'un article paru dans "Proceedings of the National Academy of Sciences" (U.S.A.), vol. 68, p. 2231-2235, et d'un manuscrit soumis à "Journal of Virology".

Le texte complet de ces deux articles suit.

RESUME DES RESULTATS

(1) TRANSCRIPTION DU VIRUS POLYOME: SYNTHÈSE ET CLIVAGE DE L'ARN TARDIF GEANT.

Des résultats précédemment obtenus dans notre laboratoire (24) suggéraient que l'ARN tardif de polyome est le produit de la transcription de la majeure partie de l'information génétique contenue dans une chaîne d'ADN viral. Nous nous sommes proposé par nos expériences de définir d'une manière plus précise la taille de l'ARN tardif du virus polyome.

Le système employé est celui de cultures primaires de rein de souris (30, 31), 28 à 30 heures après l'infection par le virus polyome, à un moment où la synthèse d'ARN viral est à son maximum, et avant que l'effet cytopathique dû à l'infection ne soit détectable. Les cultures sont marquées avec de l'uridine tritiée, un précurseur radioactif de l'ARN. L'ARN total des cellules est ensuite extrait avec du phénol à 65°C par la méthode de Scherrer et Darnell (32), dans des conditions qui tendent à minimiser toute dégradation de l'ARN. Après plusieurs précipitations à l'alcool et un traitement à la désoxyribonucléase, l'ARN est analysé soit par centrifugation sur gradients de saccharose ou de diméthylsulfoxyde (DMSO), soit par électrophorèse sur gels de polyacrylamide. La radioactivité totale de chaque fraction de gradient ou de gel est déterminée à partir d'une aliquote qui est comptée; tandis que la radioactivité contenue dans de l'ARN viral est déterminée en hybridant le reste de chaque fraction avec un excès d'ADN purifié de polyome immobilisé sur de petits filtres en nitrocellulose. L'ARN spécifiquement viral est défini par la radioactivité qui reste liée aux filtres après hybridation et qui est résistante à la ribonucléase.

Analyse de l'ARN de polyome nouvellement synthétisé.

Nous avons d'abord analysé l'ARN extrait de cultures marquées à l'uridine tritiée pendant un temps relativement court (20 min.) dans la phase tardive de l'infection. De la radioactivité totale incorporée dans de l'ARN, 10 à 20% se trouvait dans de l'ARN hybridable (la même expérience avec des cultures non infectées donne moins de 0.005%). Cet ARN a été étudié par des analyses de la vitesse de sédimentation en gradient de saccharose, ainsi que par électrophorèse sur gels de polyacrylamide. Les résultats montrent que la radioactivité totale incorporée en 20 minutes se trouve principalement dans de l'ARN de 4 à 7 S, de l'ARN 45S précurseur des ARN ribosomaux et dans une classe d'ARN polydispersé de haut poids moléculaire. Cette dernière classe d'ARN a été décrite pour d'autres types de cellules animales; elle consiste en molécules d'ARN nucléaire au métabolisme rapide qui a été appelé "ARN hétérogène nucléaire" (33,34). Le profil de l'ARN viral, obtenu par hybridation de l'ARN dans chaque fraction, suit en gros le profil de l'ARN hétérogène nucléaire de la cellule, c'est-à-dire que l'ARN viral apparaît polydispersé et de haut poids moléculaire, la plupart des molécules ayant des coefficients de sédimentation supérieurs à 28 S.

Des estimations du poids moléculaire de l'ARN de polyome, basées sur son comportement dans des gradients de saccharose et dans des gels par rapport aux ARN ribosomaux, indiquent que l'ARN viral est en majeure partie plus grand que 1.5 millions de daltons, et qu'il contient des molécules pouvant aller jusqu'à 10 millions de daltons. Or, l'ADN de polyome a un poids moléculaire d'environ 3 millions de daltons (8, 10), et l'on s'attend qu'il soit transcrit dans de l'ARN au poids moléculaire maximal de 1.5 millions de daltons.

Avant d'accepter ce résultat paradoxal, il était important de pouvoir exclure toute possibilité d'aggrégation. Nous avons donc analysé l'ARN dans des conditions dénaturantes. L'ARN de cultures marquées pendant 20 minutes a été sédimenté dans des gradients contenant 99% de diméthylsulfoxyde (DMSO) comme solvant, dans des conditions qui dénaturent complètement un ARN bicaténaire (35). Les résultats montrent que, même dans ces conditions, l'ARN hybridable reste grand et polydispersé, et qu'il a une distribution semblable à celle de l'ARN hétérogène nucléaire de la cellule. Dans d'autres expériences, l'ARN a été analysé par électrophorèse après avoir été traité avec 85% de DMSO et ensuite reprecipité (36), ou alors il a été incubé avec de l'urée 11 M et ensuite analysé en présence d'urée 8 M (44). Ces traitements n'ont pas affecté la migration de l'ARN de polyome, comparée à celle d'ARN non traité.

Nous en avons conclu que l'ARN de polyome nouvellement synthétisé est bien dans des molécules "géantes", plus longues que le génome viral, qui ne sont pas des aggrégats de molécules plus petites. Leur poids moléculaire ne peut pas être déterminé avec précision par les méthodes employées; pour cela, il faudra recourir à des méthodes indépendantes des propriétés hydrodynamiques des molécules, telles que la microscopie électronique.

Ces observations peuvent être expliquées de plusieurs manières; nous retenons ici deux modèles de transcription parmi les plus plausibles:

- Transcription continue, en plusieurs cycles, à partir d'ADN viral circulaire comme matrice.
- Transcription à partir d'ADN viral "intégré" dans de l'ADN cellulaire; dans ce cas, des séquences d'ARN cellulaire et viral pourraient être transcrites dans une même molécule.

Analyse de l'ARN de polyome après un long marquage.

Nous avons ensuite étudié l'ARN de polyome marqué à l'uridine tritiée non pas pendant un temps court, mais pendant une période de quelques heures (2 à 6), ou encore marqué pendant 20 minutes suivies d'une incubation de quelques heures dans du milieu non radioactif. En utilisant l'une ou l'autre de ces deux méthodes, qui donnent des résultats analogues, nous avons constaté que l'ARN viral ne constituait plus que le 3 à 6% de l'ARN marqué, ce qui indique qu'il a un métabolisme plus rapide que les principales espèces d'ARN cellulaire (ARN ribosomal et de transfert).

Des analyses sur gradients de saccharose et sur gels de polyacrylamide montrent l'apparition de nouveaux ARN viraux, que l'on ne trouve pas dans des cultures marquées pendant 20 minutes. Il s'agit principalement d'ARN avec des coefficients de sédimentation entre 16 et 20 S dans des gradients de saccharose, où ils constituent une large bande, parfois double; on trouve en outre une bande vers 26 S, qui est peut-être déjà présente en plus petite quantité après un court marquage. Selon son coefficient de sédimentation, l'ARN contenu dans cette bande pourrait correspondre au produit de transcription d'une chaîne d'ADN de polyome (1.5 millions de daltons).

Ces résultats suggèrent qu'après sa synthèse, une fraction au moins de l'ARN viral de haut poids moléculaire pourrait être clivée, pour donner lieu à l'apparition de nouvelles espèces de poids moléculaire plus bas. Toutefois, nous ne pouvons pas exclure la possibilité que les espèces plus petites soient synthétisées indépendamment de l'ARN géant, mais plus lentement, et qu'elles soient plus stables que celui-ci.

En conclusion, l'ARN tardif de polyome peut être décrit comme étant constitué de trois classes de molécules:

- (1) de l'ARN à distribution hétérogène, ayant des coefficients de sédimentation entre environ 30 et 80 S;
- (2) de l'ARN ayant un coefficient de sédimentation d'environ 26 S;
- (3) une classe d'au moins deux espèces d'ARN, avec des coefficients de sédimentation entre 16 et 20 S.

L'ARN de haut poids moléculaire est marqué de préférence pendant de courts marquages à l'uridine tritiée (10 à 30 minutes), tandis que les classes d'ARN 26S et 16 à 20S ne sont apparentes que dans de l'ARN marqué pendant des périodes plus longues (1 heure ou plus), et pourraient dériver du clivage d'une partie de l'ARN géant. Toutefois, il faut souligner qu'il n'y a pas à présent de preuves directes que l'ARN géant de polyome soit le précurseur des espèces plus petites.

(2) CARACTERISATION DE L'ARN MESSAGER TARDIF DE POLYOME.

Dans une deuxième série d'expériences, nous nous sommes proposé de localiser ces classes d'ARN viral à l'intérieur de la cellule et de déterminer lesquelles sont associées aux polyribosomes, et sont supposées avoir des fonctions d'ARN messager dans le cytoplasme. Nous avons donc analysé l'ARN extrait de préparations de cytoplasme et de noyaux, et ensuite de polyribosomes cytoplasmiques, isolés à partir de cultures marquées à l'uridine tritiée pendant 3 heures dans la phase tardive de l'infection (26 à 29 heures après infection).

Les résultats de ces expériences montrent que l'ARN de polyome ayant des coefficients de sédimentation de 26 S ou plus est confiné dans le noyau et n'apparaît pas dans le cytoplasme, tandis que les espèces 16S à 20S se trouvent principalement dans le cytoplasme et sont associées aux polyribosomes. Une analyse plus détaillée de l'ARN viral des polyribosomes montre qu'il se compose d'au moins deux classes distinctes, appelées "ARN 16S" et "ARN 19S tardif".

Analyse de l'ARN de polyome extrait du cytoplasme et des noyaux.

Pour chaque expérience, des cultures de cellules de reins de souris ont été marquées à l'uridine tritiée de 26 à 29 heures après l'infection par polyome. La lyse des cellules a été obtenue par l'application d'une solution à 1% du détergent non ionique Nonidet-P40 dans un tampon isotonique. Noyaux et cytoplasme ont ensuite été séparés par centrifugation.

Des analyses de la vitesse de sédimentation dans des gradients de saccharose de l'ARN extrait du cytoplasme avec un mélange phénol-chloroforme-SDS à température ambiante ont donné les résultats suivants.

La radioactivité totale se trouvait principalement dans les deux ARN ribosomaux 28S et 18S, et dans de l'ARN de transfert (4S); l'ARN spécifique de polyome était concentré dans une assez large bande avec un coefficient de sédimentation d'environ 16 S, qui présentait un léger épaulement à environ 19 S. Aucun ARN de polyome plus grand que 24 S n'a été observé dans des préparations d'ARN cytoplasmique. Ainsi, les ARN viraux "géant" et 26S, que l'on trouve dans des préparations d'ARN de cellules totales, n'apparaissent pas dans le cytoplasme.

Nous avons retrouvé ces classes d'ARN dans le culot de noyaux qui reste après la séparation du cytoplasme. Nous avons extrait l'ARN total d'un de ces culots avec du phénol-SDS à 65°C et l'avons analysé par sédimentation dans des gradients de saccharose. Le profil de la radioactivité totale était composé principalement d'ARN grand et hétérogène, de précurseurs des ARN ribosomaux et d'ARN ribosomal 28S. L'ARN hybridable se trouvait en grande partie dans des molécules à distribution hétérogène et coefficient de sédimentation supérieur à 26 S, et dans une bande à 26 S. Seule une petite quantité d'ARN viral présentait des coefficients de sédimentation inférieurs à 20 S; une partie au moins de cet ARN pourrait être due à une contamination par du cytoplasme.

Analyse de l'ARN de polyome associé aux polyribosomes.

Afin de déterminer si les classes d'ARN viral que nous avons trouvées dans le cytoplasme sont des ARN messagers, nous avons séparé les polyribosomes cytoplasmiques sur des gradients de saccharose et ensuite extrait l'ARN total de la région du gradient contenant les polyribosomes. Comme pour les expériences précédentes, les cultures étaient marquées à l'uridine tritiée de 26 à 29 heures après l'infection. L'ARN de polyome, déterminé par hybridation en 7 expériences indépendantes, constituait le 1 à 3% de l'ARN marqué.

Analyse de la vitesse de sédimentation dans des gradients de saccharose: les résultats montrent que la bande principale à 16S, aussi bien que l'épaulement à 19 S de l'ARN cytoplasmique de polyome sont présents dans des préparations d'ARN extrait de polyribosomes isolés.

L'association de ces ARN viraux avec les polyribosomes a été vérifiée dans une autre expérience. L'EDTA (tétra-acétate d'éthylène-diamine, une substance qui forme des complexes avec les cations bivalents, en l'occurrence le magnésium) provoque la dissociation des polyribosomes en sous-unités ribosomales et ARN messenger, qui sédimentent beaucoup plus lentement que des polyribosomes intacts (37,38). Or, si les ARN 16S et 19S de polyome sont associés aux polyribosomes, l'effet de l'EDTA devrait être de produire la disparition concomitante des polyribosomes et de ces ARN viraux de la région du gradient correspondant aux polyribosomes. Nous avons donc comparé la quantité d'ARN viral dans deux échantillons d'ARN: l'un était extrait de polyribosomes provenant de la moitié d'une préparation de cytoplasme (ARN témoin); l'autre était extrait de la région correspondante d'un gradient parallèle, contenant l'autre moitié du cytoplasme, qui avait été traité avec de l'EDTA 20mM. Comme prévu, le deuxième échantillon d'ARN ne contenait que des traces d'ARN viral, tandis que le témoin contenait la quantité attendue d'ARN viral 16S et 19S.

Ces ARN de polyome sont donc présents dans les polyribosomes en une association qui dépend de l'intégrité des polyribosomes mêmes, et constituent probablement des ARN messagers fonctionnels de polyome.

Analyse de la vitesse de sédimentation dans des gradients de DMSO. Dans le but d'éliminer les effets dûs à la conformation moléculaire de l'ARN de polyome, nous avons soumis l'ARN extrait de polyribosomes à des analyses par gradient de DMSO (39), dans des conditions dénaturantes (35).

Il apparaît que dans ce type de gradients, l'ARN de polyome forme une bande assez uniforme, avec un coefficient de sédimentation de 15 S par rapport aux ARN ribosomaux. Malgré la bonne résolution des gradients, nous n'avons pas trouvé d'ARN viral avec un coefficient de sédimentation de 19 S. Nous avons donc envisagé deux possibilités: ou bien l'ARN 19S était clivé dans le DMSO, ou bien sa vitesse de sédimentation relative diminuait, à la suite de changements dans la conformation des molécules. Les expériences qui suivent tendent à favoriser l'hypothèse que dans 99% de DMSO l'ARN 19S de polyome est soumis à un changement de conformation, qui est réversible après l'élimination du DMSO.

Nous avons ensuite examiné les propriétés de sédimentation en DMSO des espèces d'ARN viral 16S et 19S préalablement séparées dans un gradient de saccharose normal. Les fractions contenant respectivement les ARN 16S et 19S (marqués à l'uridine tritiée) ont été réunies. L'ARN dans chacun des deux échantillons a été précipité, repris dans du DMSO à 90% et sédimenté dans un gradient de DMSO à 99%. Comme marqueur de sédimentation, nous avons ajouté de l'ARN ribosomal 16S d'E. coli, marqué au ^{14}C . Les résultats de l'hybridation dans les deux gradients de DMSO montrent que, même dans des conditions dénaturantes, l'ARN de polyome est distribué en deux bandes. En fait, dans du DMSO l'ARN viral 16S forme une bande relativement étroite, avec un coefficient de sédimentation de 15 S (par rapport aux ARN 16S et 18S); cette bande est légèrement plus lente que l'ARN marqueur 16S. Par contre, l'ARN viral 19S forme une bande un peu plus large, avec un coefficient de sédimentation d'environ 17 S; cette bande est légèrement plus rapide que l'ARN marqueur 16S, et se différencie ainsi de celle formée par l'ARN viral 16S.

Analyse par électrophorèse sur gels de polyacrylamide.

L'ARN extrait de polyribosomes a aussi été analysé par électrophorèse sur des gels de 3% de polyacrylamide (40) et hybridation de l'ARN contenu dans chaque fraction. Dans ces gels, les deux espèces d'ARN ribosomal sont bien séparées et apparaissent sous la forme de deux bandes étroites. Par contre, le profil de l'ARN de polyome présente une distribution hétérogène entre les deux bandes d'ARN ribosomal, distribution qui est toutefois reproductible dans différentes expériences.

Afin de retrouver dans ce profil complexe les deux composants connus, à savoir les ARN 16S et 19S, nous avons à nouveau isolé ces deux classes d'ARN viral dans un gradient de saccharose, et les avons ensuite analysées individuellement par électrophorèse sur gel. Il résulte de cette expérience que l'ARN 16S constitue une assez large bande qui migre dans le gel légèrement plus lentement que l'ARN ribosomal 18S, tandis que l'ARN 19S forme une bande très large, qui migre encore plus lentement. L'addition des deux courbes obtenues avec les ARN séparés donne un profil d'ARN viral très semblable à celui obtenu avec de l'ARN non fractionné.

Dans une autre expérience, nous avons analysé sur gel l'ensemble de l'ARN viral de polyribosomes isolé préalablement dans un gradient de DMSO. Les fractions contenant l'ARN viral ont été réunies, l'ARN précipité et analysé sur un gel; sur un deuxième gel, nous avons fait migrer en même temps de l'ARN total, non traité, de polyribosomes. Le profil de l'ARN de polyome provenant du gradient de DMSO s'est révélé très semblable au profil de l'ARN non traité; les deux gels présentaient en fait la même distribution, hétérogène mais reproductible, observée dans d'autres expériences.

En conclusion, ces résultats montrent que l'ARN viral des polyribosomes contient au moins deux classes distinctes de molécules, que nous avons appelées "ARN 16S" et "ARN 19S" (tardif) sur la base de leurs coefficients de sédimentation en gradient de saccharose.

Des travaux sur des cellules en culture de rein de singe, infectées par SV40, ont montré l'existence de deux bandes d'ARN tardif de SV40 dans le cytoplasme (41) et dans les cellules totales (15). Ces résultats ont été obtenus par des analyses de la vitesse de sédimentation en gradient de saccharose. Par ailleurs, des analyses de l'ARN tardif cytoplasmique de SV40 par sédimentation dans des gradients de DMSO (42) ont montré une seule bande, qui sédimente un peu plus lentement que l'ARN 18S ribosomal.

Dans nos expériences, nous avons observé des changements réversibles de conformation qui pourraient expliquer, au moins dans une certaine mesure, la largeur des bandes formées par les ARN 16S et 19S dans des gels de polyacrylamide. Nous considérons aussi la possibilité d'une réelle hétérogénéité dans la taille des molécules, suggérée par la largeur des bandes formées dans des gradients dénaturants de DMSO. Dans ce cas, les classes d'ARN viral observées ici pourraient contenir plus d'une espèce moléculaire. Des preuves indirectes, quantitatives et biologiques (31, 43), indiquent que l'ARN 16S pourrait contenir l'information pour la synthèse de la principale protéine constituant la capsid du virus.

REFERENCES

1. Weil, R., Pétursson, G., Kára, J. and Diggelmann, H. (1967).
In "The molecular biology of viruses" (J.S. Colter and
W. Paranchych, eds.), p.593. Academic Press, New York.
2. Sambrook, J. (1972).
Advan. Cancer Res. 16 : 141. Academic Press, New York.
3. "The molecular biology of tumour viruses" (J. Tooze, ed.) (1973).
Cold Spring Harbor Laboratory.
4. Gross, L. (1953).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 83 : 414.
5. Sweet, B.H., and Hilleman, M.R. (1960).
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 105 : 420.
6. Weil, R. (1963).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 49 : 480.
7. Vinograd, J., Lebowitz, J., Radloff, R., Watson, R., and Laipis, P. (1965).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 52 : 1104.
8. Weil, R., and Vinograd, J. (1963).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50 : 730.
9. Crawford, L.V. (1964).
J. Mol. Biol. 8 : 489.
10. Caro, L.G. (1965).
Virology 25 : 226.
11. Tai, H.T., Smith, C.A., Sharp, P.A., and Vinograd, J. (1972).
J. Virol. 9 : 317.
12. Crawford, L.V., and Black, P.H. (1964).
Virology 24 : 388.
13. Winocour, E. (1965).
Virology 25 : 276.
14. Barbanti-Brodano, G., Swetly, P., and Koprowski, H. (1970).
J. Virol. 6 : 78.
15. May, E., May, P., and Weil, R. (1973).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 70 : 1654.
16. Weil, R., Salomon, C., May, E., and May, P.
Presented at the Second International Conference on Comparative
Virology, Mont Gabriel, Canada, August 1973.
17. Black, P.H., Rowe, W.P., Turner, H.C., and Huebner, R.J. (1963).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 50 : 1148.

18. Weil, R., and Kára, J. (1970).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 67 : 1011.
19. Seebeck, T. and Weil, R. (1974).
J. Virol. 13 (in press).
20. di Mayorca, G.A., Eddy, B.E., Stewart, S.E., Hunter, W.S., Friend, C.
and Bendich, A. (1959).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 45 : 1805.
21. Jackson, A.H. and Sugden, B. (1972).
J. Virol. 10 : 1086.
22. Gillespie, D. and Spiegelman, S. (1965).
J. Mol. Biol. 12 : 829.
23. Benjamin, T.L. (1966).
J. Mol. Biol. 16 : 359.
24. Hudson, J., Goldstein, D. and Weil, R. (1970).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 65 : 226.
25. Aloni, Y., Winocour, E. and Sachs, L. (1968).
J. Mol. Biol. 31 : 415.
26. Oda, K. and Dulbecco, R. (1968).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 60 : 525.
27. Sauer, G. and Kidwai, J.R. (1968).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 61 : 1256.
28. Martin, M.A. and Axelrod, D. (1969a).
Science 164 : 68.
29. Martin, M.A. and Axelrod, D. (1969b).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 64 : 1203.
30. Winocour, E. (1963).
Virology 19 : 158.
31. Pétursson, G. and Weil, R. (1968).
Arch. Gesamte Virusforsch. 24 : 1.
32. Scherrer, K. (1969).
In "Fundamental Techniques in Virology".
K. Habel and N.P. Salzman, ed. Academic Press, New York, p.413.
33. Scherrer, K., Marcaud, L., Zajdela, F., London, I.M. and Gros, F. (1966).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 56 : 1571.
34. Soeiro, R., Birnboim, H.C. and Darnell, J.E. (1966).
J. Mol. Biol. 19 : 362.
35. Strauss, J.H., Jr., Kelly, R.B., and Sinsheimer, R.L. (1968).
Biopolymers 6 : 793.

36. Katz, L. and Penman, S. (1966).
Biochem. Biophys. Res. Commun. 23 : 557.
 37. Penman, S., Vesco, C., and Penman, M. (1968).
J. Mol. Biol. 34 : 49.
 38. Perry, R.P. and Kelley, D.E. (1968).
J. Mol. Biol. 35 : 37.
 39. Acheson, N.H., Buetti, E., Scherrer, K. and Weil, R. (1971).
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 68 : 2231.
 40. Mirault, M.-E., Scherrer, K. and Hansen, L. (1971).
Eur. J. Biochem. 23 : 372.
 41. Weinberg, R.A., Warnaar, S.O. and Winocour, E. (1972).
J. Virol. 10 : 193.
 42. Tonegawa, S., Walter, G., Bernardini, A. and Dulbecco, R. (1970).
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 35 : 823.
 43. Seehafer, J.G. and Weil, R. (1974).
Virology (in press).
 44. Dobos, P. and Faulkner, P. (1970).
J. Virol. 6 : 145.
-

